

## ⑫ 公開特許公報(A)

昭61-90050

⑤ Int.Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

④ 公開 昭和61年(1986)5月8日

G 01 N 27/30

E-7363-2G

27/46

A-7363-2G

// C 12 N 11/00

7235-4B

審査請求 未請求 発明の数 1 (全4頁)

⑬ 発明の名称 バイオセンサ用チップの製造法

⑭ 特 願 昭59-212056

⑮ 出 願 昭59(1984)10月9日

⑯ 発 明 者	河 栗 真 理 子	門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
⑯ 発 明 者	南 海 史 朗	門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
⑯ 発 明 者	飯 島 孝 志	門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
⑰ 出 願 人	松下電器産業株式会社	門真市大字門真1006番地	
⑱ 代 理 人	弁理士 中尾 敏男	外1名	

## 明 細 書

## 1、発明の名称

バイオセンサ用チップの製造法

## 2、特許請求の範囲

(1) 多孔体に酸化還元酵素溶液を含浸する工程、次に多孔体を有機溶媒に浸漬した後有機溶媒を除去する工程、及び多孔体に前記酸化還元酵素と共役する酸化型色素溶液を含浸する工程、次に多孔体を有機溶媒に浸漬後有機溶媒を除去する工程により、多孔体に酸化還元酵素及び酸化型色素を担持することを特徴とするバイオセンサ用チップの製造法。

(2) 前記多孔体が親水性である特許請求の範囲第1項記載のバイオセンサ用チップの製造法。

(3) 前記有機溶媒がアルコール類、エーテル類またはケトン類から選ばれる特許請求の範囲第1項記載のバイオセンサ用チップの製造法。

## 3、発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、簡易に生体成分の特定物質を測定で

きるバイオセンサに用いるチップの製造法に関するものである。

従来の技術

簡易に生体成分の特定成分、たとえば糖、タンパク質などを調べるものとしては、尿検査の時に使用されている検査紙があげられるが、これは大まかなデータしかわからない。

最近では、簡易血糖計として、支持体に糖（グルコース）にのみ反応する酵素および酵素反応時又は酵素反応の生成物により変化する色素を含有する担体を設置したものがあつた。この担体に血液を添加し、一定時間後の色素の変化を目視又は光学的に測定することにより糖を知る方式である。~~きかてきる。~~しかし、血液中の色素により妨害されたり、酵素反応の途中で測定するため、時間の誤差が直接測定誤差となつたりする欠点があつた。

そこで、第4図のような多層式の分析担体が提案されている（実開昭54-178495号公報）。透明な支持体8の上に試薬層9、展開層10、防水層11、逕過層12が順に積層した構造となつ

ている。血液サンプルを上部から滴下すると、まず透過層12により血液中の赤血球、血小板などの固形成分が除去され、防水層11にある小孔から展開層10へ均一に浸透し、試薬層9において反応が進行する。反応終了後、透明な支持体を通して矢印の方向から光をあて、分光分析により基質濃度を測定する方式である。従来の簡易なスティック状の担体にくらべ、複雑な構造であるが、血球除去などにより精度は向上した。しかし、血液の浸透および反応に時間がかかるため、サンプルの乾燥を防ぐ防水層11が必要となったり、反応を速めるために高温でインキュベートする必要があり、装置および担体が複雑化するという問題がある。

#### 発明が解決しようとする問題点

このような従来のセンサでは測定に時間がかかったり、測定時間に精度が左右されたりする問題があった。

本発明はかかる点に鑑みてなされたもので、短時間に酵素反応を終了させ、迅速に精度よく測定

できるバイオセンサのチップを提供することを目指すとする。

#### 問題点を解決するための手段

本発明は上記問題点を解決するため、酸化還元酵素および酸化還元酵素と共役する酸化型色素を多孔体に担持させる際、これらの液を多孔体に含ました後、有機溶媒中で微小な粒子に結晶化させることにより高密度に担持するものである。

#### 作用

本発明のチップは、上記の手段により、酸化還元酵素および共役する酸化型色素が溶けやすい状態で担持されているため、生体試料が添加されると速やかに溶けて酵素反応が行なわれ、さらに高濃度の酸化還元酵素と酸化型色素により酵素反応が短時間で終了するので迅速に測定できる。

#### 実施例

第1図は本発明のチップを用いたバイオセンサの一種であるグルコースセンサの模式図である。

第1図において、1はナイロン不織布からなる多孔体である。この多孔体1は、グルコールオキシ

ダーゼ2とフェリシアン化カリウム3を担持している。その担持方法は次のとおりである。まず、多孔体1にグルコースオキシダーゼの水溶液(濃度100mg/cc)を含浸させ、次いでエタノール中に浸漬後真空乾燥をする。次に酸化型色素であるフェリシアン化カリウムの飽和溶液を前記の多孔体1に含浸させ、エタノール中に浸漬後真空乾燥する。このようにして得たチップを絶縁性の基板4と組み合わせる。基板4には白金を埋めて測定極5、対極6、参照極7として電極系を構成しており、チップはこれら電極系を覆うように設置し、その上から血液を添加する。血液中のグルコースは、グルコースオキシダーゼ2により酸化される際、酵素-色素共役反応によりフェリシアン化カリウム3が還元され、この反応によって生成されるフェロシアン化カリウムを白金からなる電極系において測定極5の電圧を参照極7を基準に0~+0.5Vの間で鋸歯状に0.1V/秒で掃引することにより酸化する。この時流れた酸化電流は色素の変化量に比例し、色素が充分存在すれば基

質濃度に対応して変化するため、電流値を測定すると基質であるグルコースの濃度が検知できる。

ナイロン不織布1にグルコースオキシダーゼの水溶液を含浸後乾燥させた後、フェリシアン化カリウムの飽和溶液を含浸し乾燥させたところ、大きな結晶となった。グルコースの濃度が250mg/dlの水溶液を添加した後、測定時間を10秒から2分までかえて応答電流を測ったところ、第2図のBのように2分たっても反応は終了しなかった。しかし、本発明の製造法に基づいて作ったチップを用いた場合は、第2図のAに示すように30秒で反応が終了し、その後は応答電流が時間に左右されず再現性よく得られた。グルコースオキシダーゼおよびフェリシアン化カリウムがエタノールに浸漬して急に結晶化されているため、粒子が非常に細かく溶けやすい状態になっていて、反応が早く進んだものと考えられる。

第3図は、グルコースオキシダーゼの担持量は同じでフェリシアン化カリウムの飽和溶液を含浸して担持した場合Cと0.5Mの溶液を含浸して担

持した場合Dの直線性を示している。飽和溶液を含浸した場合Cは750mg/dlまでよい直線性を示すが、0.5Mの場合Dは300mg/dlまでしか直線性が得られなかった。ゆえに、少量で高濃度の基質濃度を測定するには、酸化還元酵素および酸化型色素を高密度に担持する事が必要である。本発明の有機溶媒中に浸漬して速やかに結晶化させる方法により、溶けやすい状態で高密度に担持させる事が簡易にできる。さらに高濃度にする必要がある時は、再度酸化還元酵素又は酸化型色素の溶液を含浸後同様に有機溶媒中に浸漬すると微結晶が堆積して担持できる。

多孔体は、試料液を速やかに吸収し酵素反応を行なわせることができるように、親水性の多孔体であることが望ましい。ナイロン不織布の他にろ紙やパルプの不織布、セラミックの多孔体あるいはガラスの多孔体などを用いると、試料液が均一にすばやく浸透する。

有機溶媒としては、エタノールの他に、メタノールアセトンやメチルエーテルなどの水溶性のもの

のが使用できる。酸化還元酵素も上記の溶媒中で失活することなく長期間保存することができる。

実施例においては、グルコースセンサをとりあげたが、アルコールオキシダーゼやコレステロールオキシダーゼ等を用いることにより、アルコールセンサやコレステロールセンサのチップも作ることができる。

酸化型色素としては、実施例に用いたフェリシアン化カリウムが安定に反応するので適しているが、p-ベンゾキノンを使えば、反応速度が早いので高速化に適している。又、2,6-ジクロロフェノールインドフェノール、メチレンブルー、フェナジンメトサルフェート、 $\beta$ -ナフトキノン4-スルホン酸カリウムなども使用できる。

#### 発明の効果

本発明によれば、多孔体に酸化還元酵素および酸化型色素を高密度に微結晶化して担持する事ができ、短時間に高濃度まで基質濃度を測定することができる。

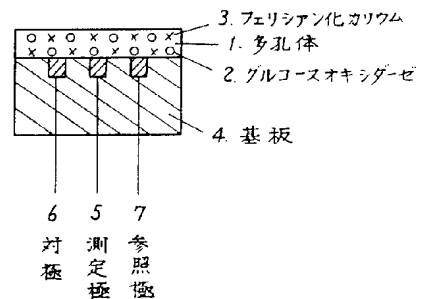
#### 4、図面の簡単な説明

第1図は本発明の一実施例であるグルコースセンサの模式図、第2図及び第3図はグルコースセンサの応答特性図、第4図は従来のグルコースセンサの模式図である。

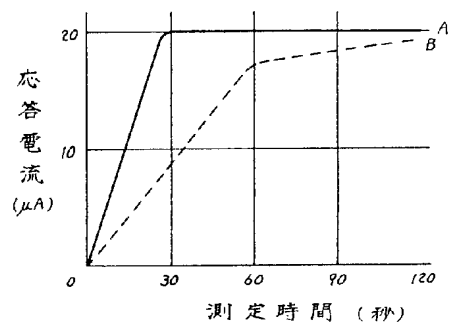
1……多孔体、2……酸化還元酵素、3……酸化型色素。

代理人の氏名 弁理士 中 尾 敏 男 ほかに1名

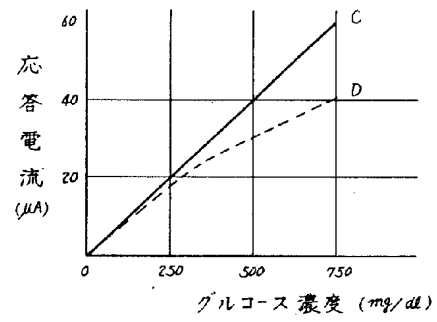
第 1 図



第 2 図



第 3 図



第 4 図

